

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie, Gastroenterologie, Diabetologie und
Stoffwechsel, Universitätsklinikum Charité, Campus Virchow-Klinikum,
Humboldt Universität zu Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Innere Medizin

**Differentielle Regulation von Schlüsselgenen der gastralen Säuresekretion
durch Gastrin, oxidativen Stress und Helicobacter pylori:
Identifikation und Charakterisierung beteiligter
Signalwege, Transkriptionsfaktoren
und regulatorischer Promotorelemente.**

vorgelegt

dem Rat der Medizinischen Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin

von Dr. med. Michael Höcker, Berlin,
geb. am 18.05.1961 in Herford

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Roland Felix

Gutachter 1: Prof. Dr. med. P. Malfertheiner, Magdeburg

Gutachter 2: Prof. Dr. med. M. Kist, Freiburg

Eingereicht am 16.03.2001
Verleihung der Lehrbefähigung: 26.03.2002

1. Hintergrund	5
1.1 Physiologische Mechanismen der Säureregulation	5
1.2 Pathophysiologische Bedeutung des gastralen Histaminmetabolismus	8
1.3 Literatur	12
2. Ziele der Untersuchung	14
3. Ergebnisse und Diskussion	16
3.1 Analyse des molekularen Sekretionsapparates gastraler ECL-Zellen	16
3.2 Regulation der gastralen HDC-mRNA Expression in vivo	17
3.3 Charakterisierung der Gastrin-responsiven Region des HDC-Promotors	18
3.4 Analyse der HDC-aktivierenden Signaltransduktionswege	20
3.5 Gastrin und CgA-Promotorregulation	22
3.6 Gewebe-spezifische Aktivierung und Gastrin-abhängige Regulation des CgA-Promotors in transgenen Mäusen	23
3.7 Inhibition der CgA-Promoteraktivität durch Interferon- α	26
3.8 Oxidativer Stress und HDC-Genregulation	27
3.9 Helicobacter pylori und HDC-Genregulation	28
4. Zusammenfassung und Ausblick	31

Abstrakt:

Die transkriptionelle Aktivierung des HDC Gens sowie des Chromogranin A Gens in ECL-Zellen der Magenmucosa repräsentiert einen zentralen Mechanismus der Säureregulation durch Gastrin und scheint ausserdem Bedeutung für die Pathogenese der gastroduodenalen Ulkuskrankheit zu haben. Unsere Untersuchungen identifizieren erstmals die molekularen Mechanismen der Gastrin-abhängigen Regulation beider Gene und definieren die beteiligten Transkriptionsfaktoren, regulatorischen DNA-Elemente und intrazellulären Signalwege. Des weiteren wurde durch transgene Untersuchungen die transkriptionelle Regulation des ChromograninA Gens *in vivo* bestätigt und die neuroendokrin-spezifische Expression eines 4.8kB-langen CgA-Promotorfragmentes demonstriert. Als pathobiologisch relevante Aktivatoren des HDC Gens konnten oxidativer Stress sowie die *H. pylori* Infektion identifiziert und hinsichtlich ihrer molekularen Wirkungen auf das Schlüsselgen der Histaminsynthese im Magen charakterisiert werden. Diese Ergebnisse dokumentieren einen potentiellen Mechanismus für die Interaktion beider Stimuli mit den physiologischen Regelkreisen der Magensäureregulation und können durch die Definition neuer molekularer Angriffspunkte möglicherweise zur Entwicklung innovativer Therapieansätze beitragen.

Schlagworte:

Gastrin, Histidinedekarboxylase Gen, Chromogranin A Gen, Magensäure, Ulkuskrankheit, transgene Mäuse, oxidativer Streß, *Helicobacter pylori*

Abstract

Transcriptional activation of the genes encoding histidine decarboxylase and chromogranin A represents a key mechanism of gastrin-dependent acid regulation and also appears to be involved in the pathogenesis of gastroduodenal ulcer disease. Our results for the first time identify the molecular mechanisms underlying gastrin-dependent activation of both genes, and define the transcription factors, regulatory DNA elements and signal transduction pathways involved in this process. Furthermore, transgenic studies confirmed the principle of gastrin-dependent transcriptional activation of the chromogranin A gene *in vivo*, and demonstrated neuroendocrine-specific expression of a 4.8kB-CgA promotor fragment. In addition, the pathobiological stimuli oxidative stress and *H. pylori* were molecularly characterized regarding their activating effects on the key gene of gastric histamine sythesis. These results provide potential mechanisms for the interaction of both stimuli with regulatory circuits of gastric acid secretion, and can probably contribute via definition of new molecular targets to the development of inovative therapeutic strategies.

Keywords:

Gastrin, histidine decarboxylase gene, chromogranin A gene, gastric acid, gastroduodenal ulcer disease, transgenic mice, oxidative stress, *Helicobacter pylori*

1. Hintergrund

1.1 Physiologische Mechanismen der Säureregulation

Nachdem ursprünglich eine direkte Wirkung des Peptidhormons Gastrin auf die säureproduzierenden Parietalzellen als Schlüsselmechanismus der Magensäureregulation postuliert wurde, muß nunmehr von einem physiologischen Konzept ausgegangen werden, demzufolge die Gastrin-abhängige Produktion und Freisetzung von Histamin aus Enterochromaffin-ähnlichen Zellen ("Enterochromaffin-like Cells" = ECL-Zellen) der Magenmukosa den zentralen Regulationsschritt der Magensäuresfreisetzung repräsentiert (1, 2). ECL-Zellen sind im basalen Drittel der säureproduzierenden Magenmukosa lokalisiert und werden aufgrund ihrer zell- und molekularbiologischen Charakteristika zum gastrointestinalen neuroendokrinen System gezählt (2, 3).

Das in ECL-Zellen gebildete Histamin repräsentiert die gemeinsame Endstrecke vagaler und peptiderger Kontrollmechanismen der Magensäuresekretion und gelangt nach Freisetzung durch einen parakrinen Mechanismus zu seinen Zielzellen, den Parietalzellen der Korpusmukosa (1-3). Hier stimuliert Histamin Säuresekretion und -Produktion durch Aktivierung von membranständigen Histamin Typ 2 (H₂)-Rezeptoren (1-3). Voraussetzung für einen regelhaften Ablauf der Säuresekretion nach einem sekretagogen Reiz ist die Neusynthese von Histamin sowie die nachfolgende, adäquate Wiederauffüllung der zellulären Histaminspeicher. Essentiell für die Histaminbiosynthese in ECL-Zellen ist die Aktivierung des Schrittmacherenzym des Histaminmetabolismus, der Histidindecarboxylase (HDC), die L-Histidin zu Histamin in einer Ein-Schritt-Reaktion konvertiert (3-5). Die enzymatische Aktivität der HDC wird hierbei im wesentlichen durch Neusynthese des Enzyms reguliert, wobei eine transkriptionelle Aktivierung des HDC-Gens von wesentlicher Bedeutung ist (5-7). Schlüsselfaktor für die Regulation der HDC-Expression und -Aktivität in ECL-Zellen ist des regulatorische Peptid Gastrin. Die Wirkung von Gastrin wird hierbei durch Aktivierung von CCK-B/Gastrin Rezeptoren, die auf ECL-Zellen lokalisiert sind, vermittelt (8, 9).

Gastrin wird in neuroendokrinen, antralen G-Zellen durch Transkription und Translation eines einzelnen Genes synthetisiert und kann nach Sekretion im menschlichen Blut in verschiedenen Molekularformen nachgewiesen werden (Gastrin-71, -52, -34, -17, -14, -6) (8). Expression und Sekretion von Gastrin unterliegen der Regulation durch den intraluminalen pH-Wert, Nahrungsbestandteile, Magendehnung sowie dem Einfluß verschiedener Neurotransmitter und regulatorischer Peptide (8). Im menschlichen Gastrointestinaltrakt

werden die biologischen Effekte von Gastrin überwiegend durch die 17 Aminosäuren-lange Isoform Gastrin-17 ausgelöst (8). Die zellulären Effekte von Gastrin werden durch funktionelle Aktivierung des CCK-B/Gastrin Rezeptors vermittelt, der zur Superfamilie G-Protein-gekoppelter Membranrezeptoren mit sieben transmembranären Domänen gerzählt wird (8). Hinsichtlich der Anbindung von CCK-B/Gastrin Rezeptoren an intrazelluläre Signalkaskaden wurden sowohl eine Stimulation der Synthese von Inositoltrisphosphat (IP₃) nach Aktivierung von Phospholipase C, als auch gesteigerte zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentrationen und Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) in verschiedenen transformierten Zelllinien und Primärzellpräparationen beobachtet (9). Die funktionelle Verknüpfung zwischen CCK-B/Gastrin Rezeptoren, gastraler Säuresekretion und HDC-Genexpression wurde kürzlich eindrucksvoll durch Beobachtungen in genetisch manipulierten Mäusen demonstriert, in denen die endogenen Allele für das CCK-B/Gastrin Rezeptor Gen oder das Gastrin Gen durch zielgerichtete Mutationen („targeted Mutation“) funktionell inaktiviert wurden (10-12). In den CCK-B/Gastrin Rezeptor-defizienten (-/-) Mäusen fand sich im Vergleich zu genetisch nicht alterierten Kontrolltieren ein deutlich erhöhter gastraler pH-Wert sowie eine komplett unterbundene HDC-Genexpression bei gleichzeitig maximal induzierter Hypergastrinämie (10-12). Demgegenüber sind Hypergastrinämien, die durch Gabe von Protonenpumpeninhibitoren, H₂-Blockern oder durch Vorliegen einer chronisch-atrophischen Gastritis ausgelöst wurden, durch Erhöhung der gastralen Histaminsynthese, eine Steigerung der HDC-Aktivität sowie eine verstärkte gastrale Expression des HDC-Gens gekennzeichnet (5, 13).

Neben den beschriebenen Veränderungen des Histaminmetabolismus sowie der HDC-Genexpression zeigten diese Studien, daß eine Erhöhung der zirkulierenden Gastrinspiegel auch zu einer Aktivierung des Chromogranin A Gens in gastralen ECL-Zellen sowie zu einer verstärkten CgA-Sekretion führt (4, 5). Chromogranin A (CgA) ist ein Matrixprotein sekretorischer, neuroendokriner Vesikel und ist in seiner Expression strikt auf das neuroendokrine System beschränkt (14). Im menschlichen Magen wird CgA überwiegend durch ECL-Zellen synthetisiert (14). Neben seiner essentiellen Rolle für die Stabilisation von neuroendokrinen sekretorischen Vesikeln, beeinflusst CgA die Pro-Hormon-Prozessierung sowie die Sortierung sekretorischer Proteine in neuroendokrinen Zellen (15). Darüberhinaus sind CgA-Spaltprodukte in der Lage, sekretorische Funktionen exokriner und endokriner Zellen zu beeinflussen (15). Dieses biologische Profil von CgA führte in Verbindung mit der Beobachtung einer parallelen, Gastrin-abhängigen Genexpression von CgA und HDC in ECL-

Zellen zu der Einschätzung, daß die funktionelle Kopplung beider Gene eine grundlegende Voraussetzung für die regelrechte Funktion von ECL-Zellen darstellt. Obwohl die Entwicklung des Modells einer parallelen, Gastrin-stimulierten HDC- und CgA-Expression wesentlich zu einem besseren Verständnis der physiologischen Zusammenhänge der Magensäureregulation beigetragen hat, blieben die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Gastrin-abhängigen HDC- und CgA-Genexpression unklar. Die Bedeutung von CgA für die sekretorischen Abläufe in neuroendokrinen Zellen wird durch die Beobachtung unterstrichen, daß Patienten mit neuroendokrinen Tumoren und gleichzeitig bestehendem Hypersekretionssyndrom regelhaft erhöhte CgA-Plasmaspiegel sowie eine intensive Expression von CgA im Tumorgewebe aufweisen (14). Die Behandlung dieser Patienten mit Interferon- α führt zu einer Verminderung der Hypersekretions-symptomatik sowie zu einer Reduktion der CgA-mRNA Expression im Tumorgewebe (16). Diese Beobachtung legt nahe, daß Interferon- α seine Wirkung hierbei zumindest teilweise durch eine Beeinflussung der CgA-Expression im Tumorgewebe herbeiführt, wobei eine Beeinflussung von transkriptionellen Mechanismen eine Rolle zu spielen scheint. Eine experimentelle Überprüfung dieser Hypothese in einem geeigneten Modellsystem stand jedoch ebenso wie die Entwicklung einer Vorstellung über die möglicherweise beteiligten molekularen Mechanismen bislang aus.

Voraussetzung für den regelrechten Ablauf von Sekretionsvorgängen in ECL-Zellen ist die Formation, membran-nahe Bereitstellung sowie die koordinierte Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran. Als strukturelle Grundlage für regulierte Sekretionsabläufe im neuroendokrinen System konnte in Nebennieren- und endokrinen Pankreaszellen ein Sekretionsapparat identifiziert werden, der in hohem Maße dem Sekretionsapparat neuronaler Zellen gleicht (17, 18). Dieser Sekretionsapparat umfaßt zwei charakteristische Vesikeltypen, sogenannte „Large Dense Core Vesicles“ (LDCVs) sowie „Small Synaptic Vesicles“ (SSVs), die jeweils durch charakteristische Inhalts- und Membranproteine identifizierbar sind (14, 19). Desweiteren umfaßt der neuronale Sekretionsapparat eine Reihe von löslichen Proteinen, die sich im Laufe des Sekretionsprozesses von LDCVs und SSVs zu einem brückenbildenden Fusionskomplex zwischen sekretorischem Vesikel und Plasmamembran zusammenschließen und hierdurch eine geregelte Fusion von Vesikeln und Zellmembran sicherstellen. Dieser Fusionskomplex umfaßt im wesentlichen die Proteine „N-ethylmaleimide-sensitive Factor“ (NSF), „Soluble NSF-attachment Proteins“ (SNAPs) sowie „SNAP Receptors“ (SNAREs), die sich wiederum in „vesikular SNAREs“ (v-SNAREs) und „target SNAREs“ aufteilen. Die

letztere Gruppe findet sich hierbei im Bereich der Plasmamembran, während v-SNAREs Bestandteile der zu fusionierenden Vesikelmembranen sind (17). Die Prozessierung von Sekretionsprodukten wie Hormonen oder regulatorischen Neuropeptiden unterliegt in neuroendokrinen Zellen dem Einfluß entsprechender prozessierender Enzyme (20). Desweiteren ist eine geeignete zelluläre Ausstattung mit vesikulären Monoamintransportern (VMATs) erforderlich, um sekretorische Vesikel mit diesen Molekülen zu beladen und somit eine Freisetzung dieser wichtigen neuroendokrinen Sekretionsprodukte zu ermöglichen (21). Im Gegensatz zu den detaillierten Vorstellungen über den Sekretionsapparat und das Expressionsmuster prozessierender Enzyme und vesikulärer Monoamintransporter in neuroendokrinen Zellen des Pankreas und der Nebenniere, blieben die entsprechenden molekularen Details des Sekretionsapparates von ECL-Zellen des menschlichen Magens bislang unklar.

1.2. Pathophysiologische Bedeutung des gastralen Histaminmetabolismus

Neben seiner zentralen Rolle als physiologischer Säurestimulus ist die Bedeutung des im Magen durch HDC-Aktivierung gebildeten Histamins für die gastroduodenale Ulkuserkrankung unbestritten. In verschiedenen tierexperimentellen Ulkusmodellen konnte gezeigt werden, daß eine pathologisch gesteigerte Histaminproduktion mit einer parallelen Steigerung der HDC-Aktivität assoziiert ist und zur Ausbildung peptischer Läsionen beiträgt (22, 23). Eine Hemmung der Histaminwirkung oder der HDC-Aktivität führt im Tiermodell zu einer deutlichen Verminderung peptischer Schleimhautläsionen (22, 23). Wesentliche Mechanismen der pathogenen Wirkung von Histamin auf die Magenmukosa scheinen eine Beeinflussung von Gefäßpermeabilität, Blutgerinnung sowie eine Modulation des Immunsystems zu sein (6, 22, 23). Im Gegensatz zu seinen ulzerogenen Wirkungen kann Histamin jedoch auch Regenerationsvorgänge der gastrointestinalen Mukosa stimulieren. Dieser Effekt wurde eindrucksvoll durch Untersuchungen in verschiedenen tierexperimentellen Ulkusmodellen belegt, wobei die Effekte von Histamin in diesem Zusammenhang durch Aktivierung von Histamin Typ 1 (H₁-Rezeptoren) vermittelt werden (6, 22, 23). An der regenerationsfördernden Wirkung von Histamin scheint neben einer Modulation der lokalen Entzündungsreaktion sowie einer Stimulation der Migration

epithelialer Zellen, auch ein direkt proliferationssteigernder Effekt auf Epithelzellen zugrundezuliegen (6, 22, 23).

Entzündliche Veränderungen des oberen Gastrointestinaltraktes sind durch erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROMs) in mukosalen Epithelzellen gekennzeichnet. Hierbei führen extrazelluläre Faktoren wie inflammatorische Zytokine oder UV-Bestrahlung sowie Veränderungen von Osmolarität und pH-Wert zur Aktivierung von epithelialen Redoxsystemen, woraus eine intrazelluläre Akkumulation von ROMs resultiert (24, 25). Diese als oxidativer Stress bezeichnete zelluläre Situation spielt eine wichtige Rolle sowohl für die Regulation akuter und chronischer Entzündungsreaktionen als auch für die Regeneration betroffener Gewebe (25). Darüberhinaus scheint eine Erhöhung des zellulären oxidativen Stresses auch für die Progression maligner Tumoren von wesentlicher Bedeutung zu sein (26). Grundlage der Wirkung von ROMs auf Epithelzellen ist die Beeinflussung einer Reihe zellulärer Funktionen wie Proliferation, Zellzyklus-Progression und Genexpression (25). Epithelzellen der Magenmukosa sind typischerweise durch pathologische Situationen wie akute oder chronische Gastritiden sowie im Rahmen der Entstehung von Ulzerationen oder malignen Läsionen erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt (25, 26). Darüber hinaus wurde in der Mukosa des oberen Gastrointestinaltraktes unter Bedingungen erhöhten oxidativen Stresses eine verstärkte Histaminsynthese sowie eine Steigerung der HDC-Aktivität nachgewiesen (26, 27). Obwohl diese Daten einen direkten Zusammenhang zwischen der Produktion von oxidativem Stress und einer Aktivierung des HDC-Histamin-Systems nahelegten, blieb bislang ungeklärt, ob oxidativer Stress hierbei einen direkten Einfluß auf die HDC-Genexpression nehmen kann und ob hieran möglicherweise transkriptionelle Mechanismen beteiligt sind.

Das duale biologische Profil des Histamins hat insbesondere durch den Nachweis eines aktivierten gastralen Histaminmetabolismus unter den Bedingungen einer *Helicobacter pylori* (Hp)-Infektion des Magens an Bedeutung gewonnen (28). Das mikroaerophile, gramnegative Bakterium *Helicobacter pylori* ist ein zentraler pathogener Faktor für die Entstehung chronischer Gastritiden und gastroduodenaler Ulzera (28, 29). Das Bakterium scheint außerdem kausal an der Pathogenese von Adenokarzinomen und mukosa-assoziierten Lymphomen (MALT-Lymphomen) des Magens beteiligt zu sein (28, 29). Die pathogene Wirkung von Hp auf die gastroduodenale Mukosa ist multifaktoriell bedingt: neben keimspezifischen Virulenzfaktoren spielen Wirtsfaktoren sowie Umweltfaktoren offenbar eine Rolle (28, 29). Während die akute Hp-Infektion zu einer vorübergehenden, die

Erstbesiedelung begünstigenden Reduktion der Magensäuresekretion führt, ist die chronische Hp-Infektion häufig durch eine Erhöhung der Magensäuresekretion und Hyperazidität gekennzeichnet (30). Hierbei ist die Aufrechterhaltung der Azidität des Magens wichtige Voraussetzung für die Persistenz von Hp, da hierdurch die Besiedelung des Magens durch andere, nicht-säureresistente Mikroorganismen erschwert wird (30). Grundlage für die Hp-assoziierte Hyperazidität ist eine Beeinflussung der physiologischen Regelkreise der Magensäuresekretion (28, 30). Neben einer Hp-getriggerten Erhöhung der zirkulierenden Gastrinspiegel sowie einer Reduktion der antralen Somatostatin-Expression (28, 30), scheint eine Interferenz des Bakteriums mit dem mukosalen Histaminstoffwechsel hierbei von Bedeutung zu sein. Eine stimulierende Wirkung von Hp auf den gastralen Histaminmetabolismus wurde in verschiedenen Studien beobachtet (31-33). Darüber hinaus wiesen Untersuchungen an isolierten ECL-Zellen der Ratte darauf hin, daß ein direkter Effekt des Bakteriums auf den Histaminmetabolismus hierbei von Bedeutung ist (33). Unklar blieb jedoch auf welche Weise ein solcher Eingriff durch Hp ablaufen könnte und ob das HDC-Gen hierbei ein Zielpunkt der Wirkung des Bakteriums ist.

Die Beobachtung, daß nur eine Minderheit der Hp-infizierten Personen schwerwiegende Erkrankungsverläufe entwickeln, die durch Entwicklung von gastroduodenalen Ulzerationen, Adenokarzinomen oder B-Zell Lymphomen gekennzeichnet sind, führte zu der Hypothese, daß neben Wirtsfaktoren auch eine Divergenz der beteiligten Hp-Stämme hinsichtlich ihres pathogenen Potentials für den klinischen Verlauf der Infektion von entscheidender Bedeutung sind (29, 34). Durch Identifizierung und Genotypisierung von Hp-Stämmen, die klinisch mit einer schwerwiegenden Schädigung der gastroduodenalen Mukosa assoziiert sind, wurden das „Vacuolating Cytotoxin A“ (VacA) sowie Genprodukte der „Cytotoxin-associated gene A“ (cagA)-Genregion als Virulenzfaktoren identifiziert, die ursächlich den unterschiedlichen klinischen Verläufen der Hp-Infektion zugrunde liegen könnten (29, 34). VacA ist ein 140-kDa großes, heterodimeres Protein mit vakuolisierender, toxischer Wirkung auf epitheliale Zellen (28, 29, 34). Obwohl das kodierende vacA-Gen in allen Hp-Stämmen zu finden ist, exprimieren nur 50% aller vacA-positiven Hp-Stämme bioaktives VacA-Protein (1, 3, 4). Infektionsexperimente mit isogenen vacA-Mutanten in Mäusen zeigten, daß dieses Protein in der Magenmukosa in vivo offenbar eine Epithelschädigung auszulösen vermag, jedoch keine Entzündungsreaktion hervorruft (4). Neben dem vacA-Gen scheinen Genprodukte des cagA-Genlocus Determinanten der Pathogenität von Hp zu sein (28, 29, 34). Die auch als „Pathogenitätsinsel“ (PAI) bezeichnete, etwa 40-kB umfassende cagA-Region enthält eine

Reihe von Genen, die für potentielle Virulenzfaktoren kodieren (34). Tierexperimentelle Untersuchungen unter Einsatz isogener Hp-Mutanten zeigten, daß der *cagA*-Genlocus eine wesentliche Rolle für die Auslösung der inflammatorischen Reaktion im Rahmen der Hp-Infektion spielt, während diese Region keine wesentliche Bedeutung für die Kolonisation durch Hp zu haben scheint (30, 34). *cagA*-positive Hp-Stämme induzieren im Vergleich zu *cagA*-negativen Stämmen in vitro eine ausgeprägtere IL-8-Produktion, sowie eine Stimulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B (30, 34). Die hieran beteiligten *cagA*-Gene kodieren für Genprodukte, die in der Bakterienmembran einen Typ IV Sekretionsapparat ausbilden (30-35). Durch Einsatz dieses Typ IV Sekretionsapparat scheint das Bakterium in der Lage zu sein, eigene Bestandteile in epitheliale Wirtszellen einzuschleusen (30-35). In welchem Umfang *cagA* und/oder *VacA*-assoziierte Virulenzfaktoren an der Wirkung des Bakteriums auf den gastralen Histaminmetabolismus beteiligt sind, oder ob möglicherweise weitere Virulenzfaktoren hierbei eine Rolle spielen, ist nicht bekannt.

Ziel unserer Untersuchungen war es daher, der Frage nachzugehen, inwieweit Hp eine direkte Wirkung auf das HDC-Gen ausüben kann und welche molekularen Mechanismen einer solchen potentiellen Wirkung zugrunde liegen. Neben der Analyse der beteiligten Signalwege, Transkriptionsfaktoren und Promotorelemente, stand eine Charakterisierung der verantwortlichen bakteriellen Virulenzfaktoren hierbei im Vordergrund.

1.3. Literatur

1. Black JW, Shankley NP (1987). How does gastrin act to stimulate oxyntic cell secretion. *Trends. Pharmacol. Sci.* 8:486-490.
2. Schubert M (1996). Gastric exocrine and endocrine secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 12: 493-502.
3. Modlin IV, Tang LH, (1996). The gastric enterochromaffin-like cell: an enigmatic cellular link. *Gastroenterology* 111: 783-791.
4. Hakanson R., Sundler F (1991). Histamine-producing cells in the stomach and their role in the regulation of acid secretion. *Scand. J. Gastroenterol.* 26 (suppl 180): 88-94.
5. Chen D, Monstein HJ, Nylander AG, Zhao CM, Sundler F, Hakanson R (1994). Acute responses of rat stomach enterochromaffin-like cells to gastrin: secretory activation and adaptation. *Gastroenterology* 107: 18-27.
6. Rangachari P.K (1993). Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am. J. Physiol.* 262: G1-G13.
7. Dimaline R, Sandvik AK (1991). Histidine decarboxylase gene expression in rat fundus is regulated by gastrin. *FEBS Let.* 281:20-22.
8. Walsh JH, Grossman MI (1975). Gastrin. *N. Engl. J. Med.* 292: 1324-1334.
9. Wank SA (1996). Cholecystokinin receptors. *Am. J. Physiol.* 269:G628-646.
10. Langhans N, Rindi G, Chiu M, Rehfeld JF, Ardmann B, Beinborn M, Kopin A (1997). Abnormal gastric histology and decreased acid production in Cholecystokinin-B/Gastrin receptor-deficient mice. *Gastroenterology* 112: 280-286.
11. Nagata A, Ito M, Iwata N, Kuno J, Takano H, Minowa O, Chihara H, Matsui T, Noda T (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11825-11830.
12. Koh TJ, Goldenring JR, Ito S, Mashimo H, Kopin AS, Varro A, Dockray GJ, Wang TC (1997). Gastrin deficiency results in altered gastric differentiation and decreased colonic proliferation in mice. *Gastroenterology* 113:1015-25.
13. Cattan D, Roucayrol AM, Launay JM, Callebort J, Charasz N, Nurit Y, Belaiche J, Kalifat R (1989). Circulating gastrin, endocrine cells, histamine content, and histidine decarboxylase activity in atrophic gastritis. *Gastroenterology* 97:586-96.
14. Wiedenmann B, Huttner WB (1989). Synaptophysin and chromogranins/secretogranins-widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 58:95-121.
15. O'Connor DT, Wu H, Gill BM, Rozansky DJ, Tang K, Mahata SK, Mahata M, Eskeland NL, Videen JS, Zhang X, Takiyuddin MA, Parmer RJ (1994). Hormone storage vesicle proteins. Transcriptional basis of the widespread neuroendocrine expression of chromogranin A, and evidence of its diverse biological actions, intracellular and extracellular. *Ann N Y Acad Sci* 733:36-45.
16. Funa, K., Eriksson, B., Wilander, B., Oberg, K. (1991). Expression of chromogranin A and B mRNA in carcinoid tumors studied by in situ hybridization. *Histochemistry* 95: 555-559.
17. Südhoff TC (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-653.
18. Rothman JE (1994). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 372:55-63.
19. Bauerfeind R, Ohashi M, Huttner WB (1994). Biogenesis of secretory granules and synaptic vesicles. *Ann N Y Acad Sci* 733:233-245.
20. Iacangelo AL, Eiden LE (1995). Chromogranin A: current status as a precursor for bioactive peptides and a granulogenic/sorting factor in the regulated secretory pathway. *Reg Pept* 58:5-

21. Peter D, Liu Y, Sternini C, de Giorgio R, Brecha N, Edwards RH (1995) Differential expression of two monoamine transporters. *J Neurosci* 15:6179-681.
22. Andersson K, Mattsson H, Larsson H (1990). The role of gastric mucosal histamine in acid secretion and experimentally induced lesions in rats. *Digestion* 46: 1-9.
23. Bouclier M, Jung MJ, Gerhart F (1983). Histamin receptor blockade versus inhibition of histamin synthesis in stress ulceration in rats. *Eur J Pharmacol* 90: 129-132.
24. Weiss SJ (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320:365-76.
25. Kehrer JP (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 23:21-48.
- 26.. Drake IM, Davies MJ, Mapstone NP, Dixon MF, Schorah CJ, White KL, Chalmers DM, Axon AT (1996). Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. *Carcinogenesis* 17:559-62.
27. Fujimoto K, Imamura I, Granger DN, Wada H, Sakata T, Tso P (1992) Histamine and histidine decarboxylase are correlated with mucosal repair in rat small intestine after ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 89:126-33
28. Malfertheiner P, Miehlke S (1999). *Helicobacter* infection in ulcer pathogenesis. *Digestion* 58 (suppl. 1):17-20.
29. Nedrud JG, Czinn SJ (1997). *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol* 13:71-78.
30. Peek RM, Blaser MJ (1996). Pathophysiology of *helicobacter pylori*-induced gastritis and peptic ulcer disease. *Am J Med* 102: 200-207.
31. Ben-Hamida A, Man WK, McNeil N, Spencer J (1998). Histamine, xanthine oxidase generated oxygen-derived free radicals and *helicobacter pylori* in gastroduodenal inflammation and ulceration. *Inflamm Res* 47:193-199.
32. Bechi P, Romagnoli P, Bacci S, Die R, Amorosi A, Cianchi F, Masini E (1996). *Helicobacter* and duodenal ulcer: evidence for a histamine pathways-involving link. *Am J Gastroenterol* 91:2339-2343.
33. Kidd M, Miu K, Tang LH, Prez-Perez GI, Blaser MJ, Sandor A, Modlin IM (1997). *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates histamine release and DNA synthesis in rat enterochromaffin-like cells. *Gastroenterology* 113: 1110-1117.
34. Mègraud F (1997). Pathogenic diversity of *helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 32:278-281.
35. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R (2000). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287:1497-500.

2. *Ziele der Untersuchung*

Neben der Bereitstellung von Sekretionsprodukten und deren Verpackung in sekretorische Vesikel, ist die nachfolgende Vesikelfusion mit der Plasmamembran ein zentraler Schritt neuroendokriner Sekretionsabläufe. Grundlage hierfür bildet ein komplexer Sekretionsapparat, der in seinem Aufbau in neuronalen Zellen bereits aufgeklärt werden konnte. Da über die molekularen Details des Sekretionsapparates in menschlichen ECL-Zellen weitgehend Unklarheit bestand, war es Ziel der Untersuchungen weiteren Aufschluß hierzu zu erbringen. Darüberhinaus sollte geklärt werden, ob im Laufe der Transformation normaler ECL-Zellen zu ECLomen Veränderungen im Aufbau des neuroendokrinen Sekretionsapparates festzustellen sind.

Die koordinierte Regulation der Gene für Histidindecaboxylase und Chromogranin A durch das Peptidhormon Gastrin in ECL-Zellen des Magens ist von wesentlicher Bedeutung für die Säureregulation des menschlichen Magens. Trotz der physiologischen Bedeutung dieses Regulationsmechanismus sind die molekularen Abläufe der Wirkung von Gastrin hierbei weitgehend unverstanden. Ziel der Untersuchungen war es daher, die der Wirkung von Gastrin auf die Expression beider Gene zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu analysieren sowie die beteiligten Signaltransduktionswege, Transkriptionsfaktoren und regulatorischen DNA-Elemente aufzuklären.

Nach Charakterisierung des Chromogranin A-Promotors und seiner Regulation in vitro, sollte in in vivo Experimenten geprüft werden, ob ein CgA-Promotorfragment in transgenen Mäusen eine ECL-Zell-/neuroendokrin-spezifische Expression herbeiführen kann und ob hierbei auch unter in vivo Bedingungen eine Gastrin-abhängige Regulation des CgA-Promotors festzustellen ist. Langfristige Zielsetzung dieses transgenen Experimentes ist die Entwicklung von transgenen Mausmodellen auf der Basis des CgA-Promotors, die weitere Untersuchungen des gastralen und extra-gastralen neuroendokrinen Systems in vivo erlauben.

Eine Inhibition der CgA-Genexpression in neuroendokrinen Tumoren scheint einen Mechanismus der supprimierenden Wirkung von Interferon- α auf das Hypersekretionssyndrom neuroendokriner Tumorpatienten darzustellen. Da bislang keine Vorstellungen hinsichtlich eines potentiellen Wirkmechanismus von Interferon- α hierbei vorlagen, sollten in

in vitro Untersuchungen Aufschluß darüber erbringen, inwieweit der CgA-Promotor in seiner Aktivität durch Interferon- α beeinflusst werden kann und ob sich hieraus neue Ansätze zur Therapie des neuroendokrinen Hypersekretionssyndroms ergeben können.

Neben seiner zentralen Rolle als säureregulierender Mediator ist Histamin an der Pathogenese von Gastritiden und gastroduodenalen Ulzerationen beteiligt. Hierbei scheint eine Aktivierung des HDC-Gens durch zellulären oxidativen Stress sowie durch *Helicobacter pylori* von wesentlicher Bedeutung zu sein. Um die bislang nur lückenhaften Vorstellungen zur Regulation des HDC-Gens unter diesen pathologischen Bedingungen zu ergänzen und möglicherweise neue therapeutische Angriffspunkte definieren zu können, untersuchten wir die Wirkung von oxidativem Stress und von *Helicobacter pylori* auf die Regulation des humanen HDC-Gens in einem in vitro-Modell.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Analyse des molekularen Sekretionsapparates gastraler ECL-Zellen

Als Grundlage für die weiteren Studien erfolgte zunächst eine detaillierte Charakterisierung der Komponenten des Sekretionsapparates von ECL-Zellen des menschlichen Magens. Darüberhinaus sollte im Rahmen dieser Untersuchung geklärt werden, ob das in „normalen“ ECL-Zellen nachweisbare Expressionsmuster dieser Proteine im Verlaufe der Transformation dieses Zelltyps zu ECLomen einer Veränderung unterliegt. Zusammenfassend zeigte unsere Studie, daß ECL-Zellen des menschlichen Magens die typischen Bestandteile des neuroendokrin-neuronalen Sekretionsapparates aufweisen, der neben t-SNARE- und v-SNARE Proteinen auch das 25-kDa SNAP-Protein (Synaptosome-Associated Protein) sowie Syntaxin und Synaptobrevin umfaßt (10). Außerdem ließ sich neben der Präsenz des vesikulären Monoamintransporters Typ 2 (VMAT2), die Expression der Hormonprozessierenden Enzyme Prohormonconvertase Typ1 und Carboxypeptidase E (CPE) in ECL-Zellen nachweisen. Hierdurch wurde demonstriert, daß der in neuronalen Zellen sowie in neuroendokrinen Zellen des Nebennierenmarkes und des endokrinen Pankreas nachgewiesene Sekretionsapparat, auch der sekretorischen Aktivität von ECL-Zellen des menschlichen Magens zugrundeliegt. Ein Vergleich des Expressionsmusters dieser Proteine in untransformierten ECL-Zellen mit dem von ECLomen zeigte, daß die Expression des Sekretionsapparates, prozessierender Enzyme sowie des vesikulären Monoamintransporters Typ 2 im Verlauf der ECL-Zell-Transformation aufrechterhalten wird und hierdurch die strukturelle Grundlage für eine sekretorische Aktivität von ECLomen erhalten bleibt (10). Nachdem durch diese Untersuchungen wesentliche Strukturelemente des Sekretionsapparates menschlicher ECL-Zellen des Magens identifiziert werden konnten, war es Ziel der nachfolgenden Studien, die molekularen Mechanismen zu erarbeiten, die der Wirkung von Gastrin, dem zentralen peptidergen Stimulus von ECL-Zellen, auf seine Zielgene Histidinekarboxylase und Chromogranin A zugrundeliegen. Da diese beiden Gastrin-regulierten Gene eine zentrale Rolle für die Säureregulation im menschlichen Magen spielen, können weitere Einblicke hinsichtlich der molekularen Mechanismen ihrer Regulation durch Gastrin, einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis dieses physiologisch und pathophysiologisch wichtigen Regulationszusammenhangs erbringen.

3.2. Regulation der gastralen HDC-mRNA Expression in vivo

Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, daß Hypergastrinämien unterschiedlicher Genese mit vermehrter gastraler HDC-mRNA Expression einhergehen. Unklar blieb hierbei, in welchem Zusammenhang die HDC-mRNA Expression zum Ausmaß und Zeitdauer der Hypergastrinämie steht und ob die Expressionsveränderungen mit der Kinetik einer transkriptionellen Regulation vereinbar sind. Zur Beantwortung dieser Fragen analysierten wir die HDC-mRNA Expression im Magen von Ratten nach Erzeugung einer Hypergastrinämie durch intraperitoneale Injektion des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol, wobei konventionelle "Northern Blot"-Techniken sowie das Verfahren der "in situ"-Hybridisierung verwendet wurden (1, 2). Da Analysen der Histaminspiegel und der HDC-Proteinexpression darauf hinwiesen, daß die HDC-Expression einem gewebe- und entwicklungsspezifischen Muster unterliegt, wurde das HDC-mRNA Expressionsmuster in verschiedenen Geweben erwachsener Ratten sowie im Verlaufe der Embryonalphase durch „Northern Blot“-Analyse untersucht. Unsere Untersuchungen zeigten, daß eine Omeprazol-induzierte Hypergastrinämie in der Korpusmukosa von Ratten innerhalb von 12 h zu einer 4-5-fachen Erhöhung der HDC-mRNA Konzentrationen führt. Durch nachfolgende in situ Hybridisierungen konnten die im „Northern Blot“ beobachteten HDC-mRNA-Expressionsveränderungen den ECL-Zellen der Korpusmukosa zugeordnet werden (1, 2). Parallel hierzu durchgeführte Messungen der Gastrin-Plasmakonzentrationen zeigten, daß die Plasmaspiegel des Peptidhormons 5-6-fach gegenüber Kontrollwerten erhöht waren (2). Die Untersuchung des gewebespezifischen Expressionsmusters zeigte in fetalen Ratten hohe HDC-mRNA-Konzentrationen in der Leber und weniger ausgeprägte HDC-mRNA-Expression in Magen und Pankreas (1). Die Analyse des perinatalen Zeitverlaufes der HDC-mRNA Expression zeigte parallele Expressionsverläufe des HDC-Gens in Magen und Leber. Hohe HDC-mRNA-Konzentrationen fanden sich in beiden Organen pränatal. Nach der Geburt fand sich zunächst keine HDC-Expression, erst am 7. postnatalen Tag war eine Expression von HDC-Transkripten in beiden Organen wieder detektierbar, wobei die gastrale HDC-mRNA Expression deutlich überwog (1). Zusammenfassend bestätigten unsere Studien die Beobachtung, daß es unter Bedingungen einer Hypergastrinämie zur Erhöhung der gastralen HDC-mRNA-Expression kommt. Hierbei entspricht der, in der vorliegenden Untersuchung

erstmals erhobene detaillierte Zeitverlauf der HDC-mRNA-Expression unter Hypergastrinämie, einer transkriptionellen Regulation des HDC-Gens durch Gastrin. Darüberhinaus wurden die beschriebenen HDC-Expressions-veränderungen unter Hypergastrinämie durch unsere „in situ“-Hybridisierungen erstmals direkt dem ECL-Zell-Kompartiment der Magenmukosa zugeordnet. Die Analyse der embryonalen HDC-mRNA-Expression demonstrierte erstmals, daß es im Verlaufe der embryonalen Entwicklung zu einer Veränderung des gewebespezifischen Expressionsmusters des HDC-Gens kommt, wobei die zentrale Rolle des Magens als Expressionsort der HDC in der post-partialen Entwicklung unterstrichen wurde. Basierend auf diesen in vivo-Daten war es Ziel der weiteren Untersuchungen, die Wirkung von Gastrin auf die transkriptionelle Aktivität des HDC-Gens durch molekularbiologische in-vitro Untersuchungen weiter zu charakterisieren sowie die hieran beteiligten molekularen Mechanismen zu identifizieren. Hierbei stand neben der Analyse der beteiligten Signalwege und Transkriptionsfaktoren eine Charakterisierung der verantwortlichen Promotorelemente im Vordergrund.

3.3. Charakterisierung der Gastrin-responsiven Region des HDC-Promotors

Ein grundsätzliches Problem von molekularen Untersuchungen der Biologie von ECL-Zellen besteht in der fehlenden Verfügbarkeit einer permanenten ECL-Zelllinie für in vitro Untersuchungen. Hierbei ist die Etablierung einer permanenten humanen ECL-Zelllinie vor allem auch durch die Tatsache erschwert, daß technische Limitationen keine Präparation einer reinen ECL-Zellpopulation aus der Magenmukosa zulassen. Vor diesem Hintergrund wurde die humane Magenadenokarzinom-Zelllinie AGS-B als Zellmodell für die nachfolgenden funktionellen HDC-Promotoranalysen etabliert (1, 2). Von uns durchgeführte immunhistochemische Analysen zeigten, daß diese Zelllinie typische neuroendokrine Markerproteine wie Chromogranin A, Syntagmin und Synaptophysin exprimieren und somit eine neuroendokrine Differenzierung aufweisen (2). Da AGS-Zellen endogen keine CCK-B/Gastrin-Rezeptoren exprimieren, wurde ein Expressionskonstrukt für den humanen CCK-B/Gastrin-Rezeptor stabil in diese Zelllinie transfiziert (1, 2). Die nachfolgende rezeptorphanakologische Analyse von CCK-B/Gastrin-Rezeptor-exprimierenden AGS-B Zellklonen ergab, daß die durch AGS-B-Zellen exprimierten CCK-B/Gastrin-Rezeptoren

hinsichtlich von Bindungseigenschaften und Rezeptorzahl den Charakteristika von "Wild-Typ"-Rezeptoren entsprechen (2).

Nach Etablierung der AGS-B Zelllinie erfolgte zunächst eine initiale Charakterisierung der HDC-Promotoren von Ratte und Mensch unter Verwendung von 1,8 kB- (Mensch) oder 1,3 kB-langen (Ratte) Fragmenten der HDC-5'-flankierenden Region. Hierzu wurden die entsprechenden Promotorfragmente nach Klonierung aus genomischen DNA-Bibliotheken von Ratte und Mensch isoliert und in Reportergenvektoren, die das Luciferase Reportergen umfaßten, kloniert (2, 4). Die funktionelle Analyse dieser HDC-Luciferase Reportergenkonstrukte zeigte eine dosis- und zeitabhängige Stimulation der transkriptionellen Aktivität beider HDC-Promotoren durch Gastrin und sein Analogon CCK-8 (2, 4). Die zur Eingrenzung des Gastrin-responsiven Bereiches der HDC-Promotoren durchgeführte 5'-Deletionsanalyse zeigte, daß ein entsprechendes DNA-Element für beide Gene in proximalen Promotorabschnitten lokalisiert ist (2, 4). Durch Konstruktion und transiente Transfektion von 5'- und 3'-Promotor-Deletionsmutanten wurde eine weitere Eingrenzung der Gastrin-responsiven DNA-Sequenz im humanen HDC-Promotor erreicht (4, 8). Hierbei zeigte sich, daß die Gastrin-abhängige Stimulation durch ein Gastrin-responsives, cis-regulatorisches Element (GAS-RE) im palindromen Sequenzbereich 5'-+1-ACCCTTTAAATAAAGGGCCACACTGG+27-3', vermittelt wird (4, 8). Dieses Gastrin-responsive Element (GAS-RE), das keine Homologien zu bislang bekannten „Enhancer“-Elementen aufweist, war in der Lage nach Subklonierung in ein heterologes, Gastrin-unsensibles Promotor-Reportergen System (Herpes Simplex Virus (HSV)-Thymidinkinase-Luciferase), Stimulierbarkeit durch Gastrin zu vermitteln (4, 8). Hierbei war die Gastrin-Sensitivität dieses Elementes unabhängig von der Orientierung oder Distanz zum "Enhancer"-losen Thymidinkinase Minimalpromotor (4, 8). Die weitere Charakterisierung dieser Sequenz durch „Electrophoretic-Mobility-Shift-Analyse“ (EMSA) zeigte eine spezifische Bindung von zwei nukleären Proteinen (Transkriptionsfaktoren) mit einem Molekulargewicht von 35 kDa und 52 kDa an diesen Sequenzbereich (8). Hierbei stimuliert Gastrin die spezifische Bindung beider Proteine mit identischer Kinetik an den proximalen (hHDC +1 bis +19) oder distalen (hHDC +11 bis +27 Bp) Teil der GAS-RE Gesamtsequenz (+1 bis +27 Bp) (8). EMSA-Supershift-Analysen sowie erste Daten zur Proteinsequenz beider Faktoren deuten darauf hin, daß es sich hierbei um unbekannte Transkriptionsfaktoren handelt (8). Durch diese Untersuchungen konnte nach Etablierung einer transkriptionellen Regulation der HDC-Promotoren von Ratte und Mensch erstmals der Gastrin-responsive Bereich des

humanen HDC-Promotors identifiziert und in seiner Sequenz aufgeklärt werden. Darüberhinaus wurden die an dieses Element bindenden nukleären Proteine als neuartige, bislang nicht beschriebene Transkriptionsfaktoren identifiziert.

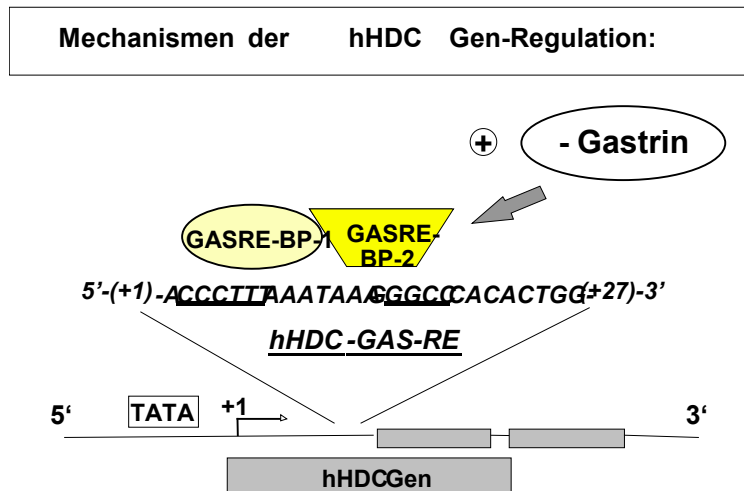


Abb. 1. Schematische Darstellung der Promotorelemente und Transkriptionsfaktoren, die an der Vermittlung des Gastrineffektes auf den hHDC Promotor beteiligt sind. Abkürzungen: GAS-RE-BPs = Gastrin-responsive Element Binding Proteins; HDC-GAS-RE = HDC-Gastrin-responsives Element; TATA = TATA-Box. Weitere Einzelheiten siehe Text.

3.4. Analyse der HDC-aktivierenden Signaltransduktionswege

Nach der Identifikation und strukturellen Aufklärung des Promotorbereiches, der die Wirkung von Gastrin auf das menschliche HDC-Gen vermittelt sowie der Charakterisierung der hieran bindenden Transkriptionsfaktoren, sollte in den weiterführenden Studien die intrazelluläre(n) Signalkaskade(n) aufgeklärt werden, durch die Gastrin eine transkriptionelle Aktivierung des HDC-Gens auslöst. Hierzu wurden zunächst durch Einsatz geeigneter Reagentien verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden (cAMP-, Ca^{2+} , PKC-Signalwege) in AGS-B Zellen selektiv aktiviert und die Auswirkung dieser Manipulationen auf den HDC-Promotor untersucht. Es zeigte sich, daß im Gegensatz zu der in verschiedenen Systemen dokumentierten stimulatorischen Wirkung von Ca^{2+} -vermittelten Signalwegen auf die Histaminsekretion, die transkriptionelle Aktivität der HDC-Promotoren durch diese Signalkaskaden nicht stimuliert werden kann (2, 4). Im Gegensatz hierzu führte direkte

Aktivierung von Kinasen der Proteinkinase C (PKC)-Familie durch Anwendung des Phorbolesters PMA zur einer ausgeprägten Stimulation der hHDC-Promotoraktivität. Darüberhinaus war der transaktivierende Effekt von Gastrin auf beide HDC-Promotoren durch Blockade von PKCs komplett zu unterbinden (2, 4). Da PKC-abhängige Effekte häufig durch den AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplex vermittelt werden, untersuchten wir die Bedeutung von AP-1 für die Gastrin-abhängige Aktivierung des HDC-Promotors im AGS-B Zellmodell (3). Zusammenfassend zeigten unsere Untersuchungen hierbei, daß PKC-abhängige Aktivierung des AP-1-Komplexes essentiell für die Vermittlung des Effektes von Gastrin ist, wobei die Wirkung von AP-1 jedoch indirekt sein muß, da der HDC-Promotor nicht durch AP-1 gebunden wird (3). Im weiteren Verlauf der Signaltransduktions-Analyse zeigte sich, daß Kinasen der „Mitogen-aktivierten Proteinkinase“-Familie (MAPKinase-Familie) eine wesentliche Rolle für die Vermittlung der Wirkung von Gastrin auf das Gastrin-responsive Element des HDC Promotors einnehmen (5). Die MAP Kinase-Superfamilie umfasst im wesentlichen die beiden Untergruppen der "Extracellular Mitogen-Related Kinases" (ERKs) und "Jun-Kinases" (JNKs). Beide Kinasegruppen sind unterschiedlichen intrazellulären Signalkaskaden zuzuordnen, wobei ERK-Signalwege vorrangig durch "klassische" Wachstumsfaktoren und Mitogene wie „Epidermal Growth Factor“ (EGF) stimuliert werden können. JNK-vermittelte Signalkaskaden hingegen werden bevorzugt durch zelluläre Streßsituationen wie UV-Exposition oder Zytokine aktiviert. Unsere Untersuchungen zeigten, daß die Effekte von Gastrin auf den hHDC Promotor durch eine sequentielle Aktivierung einer Signalkaskade vermittelt werden, die in der Sequenz PKCs > Raf > MEK-1 > ERKs verläuft und von Gastrin durch einen Ras-unabhängigen Mechanismus aktiviert wird (5 und Abb.1). JNK-assoziierte Signalwege spielen für die Wirkung von Gastrin in diesem Zusammenhang keine Rolle, obwohl der hHDC-Promotor durch die JNK-Kaskade potent transaktiviert werden kann (5). Durch diese Ergebnisse wurden sie intrazelluläre Signalkaskade, die der Wirkung von Gastrin auf das Schlüsselgen der Histaminsynthese zugrundeliegt erstmals aufgeklärt, wodurch eine Basis für weitere molekulare Analysen der Abläufe Gastrin-abhängiger Genregulation im Magen geschaffen wurde. Angesichts der Bedeutung von Gastrin für die Kontrolle von gastraler Säureregulation, Mukosaproliferation und –Differenzierung können diese Daten einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis dieser Abläufe leisten und helfen, neue molekulare Interventionspunkte zu definieren.

3.5. *Gastrin und CgA-Promotorregulation*

Die parallele Aktivierung des HDC- und CgA-Gens durch Gastrin in ECL Zellen des menschlichen Magens ist von wesentlicher physiologischer Bedeutung für den regelhaften Ablauf der Magensäuresekretion. Nach Identifizierung der Signalwege, Transkriptionsfaktoren und DNA-Elemente, die der Wirkung von Gastrin auf das humane HDC-Gen zugrundeliegen, war es Ziel der weiterführenden Untersuchungen, zu klären durch welche Mechanismen Gastrin eine Aktivierung des CgA-Gens herbeiführt und inwieweit die hierbei beteiligten molekularen Mechanismen Übereinstimmungen mit dem HDC-regulierenden Mechanismus aufweisen. Unsere Untersuchungen unter Verwendung von CgA-Reportergenkonstrukten zeigten, daß Gastrin-Stimulation von AGS-B Zellen zu einer dosisabhängigen Aktivierung des CgA-Promotors führt, die in ihrer Kinetik mit der Wirkung des Peptides auf den HDC-Promotor vergleichbar ist (7). Durch eine Kombination von 5'-Deletionsanalyse und gerichteter Promotor-Mutagenese konnte in funktionellen Untersuchungen ein Element im Bereich von CgA -92 bis -62 Bp als Gastrin-responsives Element des CgA-Gens identifiziert werden, wobei dieser Bereich keine relevanten Sequenzhomologien zum HDC-Promotor aufweist. Darüberhinaus zeigten EMSA-Studien, daß der Sequenzbereich CgA 5'-92/-62 -3' Bp nicht durch die HDC-aktivierenden Transkriptionsfaktoren GAS-RE-BPs gebunden wird und somit ein weiteres, neues Gastrin-responsives Element (GAS-RE) repräsentiert (7). Durch funktionelle Mutationsanalyse dieses Elements konnte nachgewiesen werden, daß zwei Transkriptionsfaktor-Bindungsgebiete innerhalb dieser Sequenz für die Gastrin-abhängige Regulation essentiell sind: hierbei handelt es sich um eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CREB (Cyclic AMP Binding Protein) sowie um ein Bindungselement für den Transkriptionsfaktor Sp1 (7). EMSA-Studien unter Verwendung dieses Elements zeigten, daß Gastrin die Bindung beider Transkriptionsfaktoren an das CgA -92/-62 Bp Element stimuliert. Hingegen führt eine Mutation der Sp1- oder der CREB-Bindungsstelle zum Verlust der Gastrin-Sensitivität des CgA-Promotors (7). Ko-Expressionsexperimente unter Einsatz von entsprechenden Sp1- und CREB-Konstrukten zeigten, daß beide Faktoren eine synergistische Wirkung auf den CgA-Promotor haben (7). Eine Analyse der vermittelnden Signalwege erbrachte den Nachweis, daß der Effekt von Gastrin auf den CgA-Promotor durch den gleichen Signalweg vermittelt wird,

der durch das Peptidhormon auch im Zusammenhang mit der Transaktivierung des HDC-Gens aktiviert wird. Darüberhinaus konnte die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren CREB und Sp1 durch diese Kaskade als wesentlicher funktioneller Schritt der Gastrin-abhängigen Transaktivierung des CgA-Gens identifiziert werden (7). Diese Ergebnisse dokumentieren, daß die Gastrin-abhängige Regulation des HDC- und CgA-Gens in Magenepithelzellen offenbar durch Aktivierung der gleichen Signalkaskade herbeigeführt wird, sich jedoch auf der Ebene der Promotorelemente und hieran bindender Transkriptionsfaktoren grundsätzlich unterscheidet.

3.6. *Gewebe-spezifische Aktivierung und Gastrin-abhängige Regulation des CgA-Promotors in transgenen Mäusen*

Nach Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die der transaktivierenden Wirkung von Gastrin auf den CgA-Promotor in Magenepithelzellen zugrundeliegen, sollte in nachfolgenden transgenen in vivo-Experimenten untersucht werden, inwieweit durch Einsatz eines CgA-Promoterfragmentes, eine neuroendokrin-/ECL-Zell-spezifische Expression von heterologen Proteinen in einem transgenen Mausmodell herbeizuführen ist.

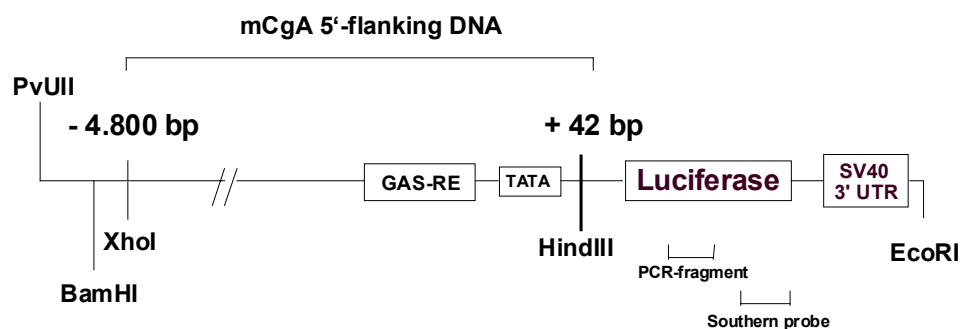


Abb. 2 Schematische Struktur des mCgA4.8kB-Luc Konstruktes. Abkürzungen: GAS-RE: Gastrin-responsive Element; TATA= TATA-Box Element; Restriktionsenzym Schnittstellen: Pvu II; BamHI; XhoI; HindIII; Die Klammern im Bereich der Luciferase Sequenz bezeichnen Genabschnitte, die in PCR-Assays oder durch „southern Blot Analyse“ detektiert wurden.

Desweiteren sollte in diesen Studien geklärt werden, ob in einem solchen transgenen Mausmodell eine Gastrin-abhängige Regulation des CgA-Promotors auch unter in vivo Bedingungen nachzuweisen ist. Zur Herstellung eines entsprechenden transgenen Modells wurde ein Konstrukt angefertigt, in dem die Expression des Luciferase Reportergens unter der Kontrolle von 4.8 kB der CgA-Promotors der Maus steht (Abb. 2 und 12). Das Luciferase-Reportergen eignet sich für diesen Zweck besonders, da es durch ein einfaches und hochsensitives Verfahren in Gewebelysaten quantitativ nachgewiesen werden kann und hierdurch sowohl die Identifizierung von Reportergen-exprimierenden Geweben als auch quantitative Studien des Expressionsverhaltens des Transgens deutlich erleichtert werden. Darüberhinaus stehen kommerzielle Antikörper für eine immunhistochemische Analyse der Luciferase-Expression zur Verfügung.

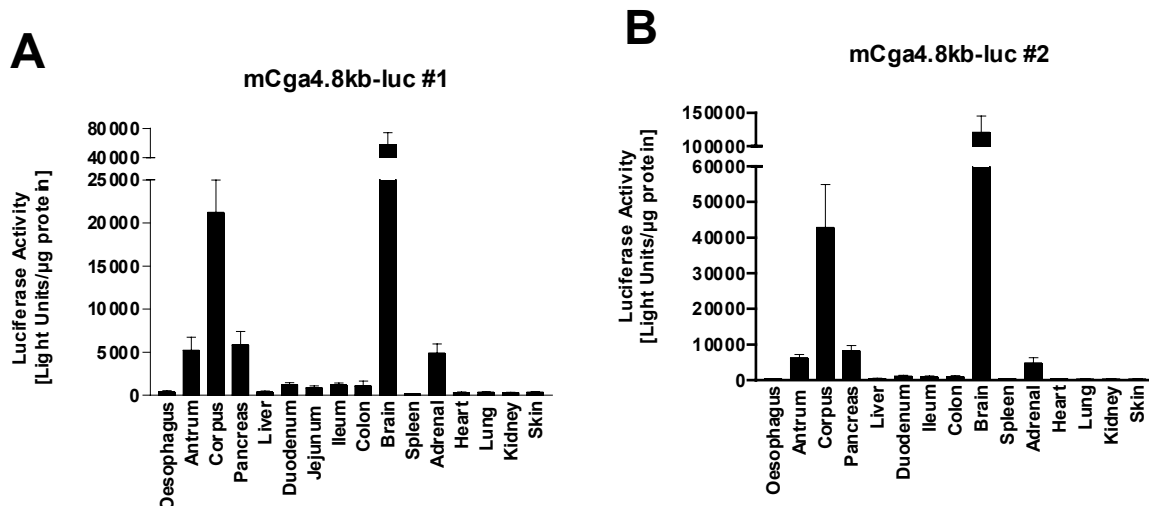


Abb. 3 Gewebespezifische Expression des CgA4.8kB-Luciferase Transgens. Dargestellt sind die, der Expression des Transgens entsprechenden Luciferase Aktivitäten in verschiedenen Organen transgener Mäuse. Die in (A) und (B) dargestellten Daten entsprechen hierbei den Expressionswerten zweier unabhängiger Mauslinien.

Daher wurde unter Einsatz von Standardtechniken das CgA-Luciferase-Konstrukt in die Keimbahn von Mäusen eingebracht und durch „Southern Blot“- und PCR-Analysen von genomischer DNA insgesamt vier verschiedene transgene Mauslinien mit einer stabilen Integration des 4.8kB CgA-Luciferase Transgens identifiziert. Nach Expansion dieser Linien wurde die Expression des Transgenes immunhistochemisch unter Verwendung eines

spezifischen Luciferase-Antikörpers sowie durch Luciferase-Assays in Gewebelysaten und PCR-Analysen charakterisiert. Hierbei fand sich für das 4.8kBCgA-Luciferase Transgen ein Expressionsmuster, daß strikt dem Expressionsmuster des endogenen CgA-Gens entsprach (Abb. 3). Die Expression des Transgens war dabei ausschließlich in neuroendokrinen Zellen zu finden, während in nicht-neuroendokrinen Epithelzellen keine Expression nachzuweisen war (12). Im Magen der 4.8kBCgA-Luciferase Mäuse fand sich eine Expression des Transgens in ECL-Zellen, Gastrin-produzierenden G-Zellen des Antrums sowie in Somatostatin-produzierenden D-Zellen, wobei die Expression in ECL-Zellen quantitativ weit überwog. Die Wirkung von Gastrin auf die Aktivität des Transgenes wurde nach Erzeugung einer Hypergastrinämie durch mehrfache Injektion des Protonenpumpenblockers Omeprazol untersucht. Hierbei zeigte sich in 4.8kBCgA-Luciferase Mäusen eine selektive Erhöhung der Luciferase-Expression im Bereich des Magenkorpus, während im Bereich des Antrums keine Veränderungen der Luciferaseaktivität und somit der Aktivität des Transgens festzustellen war (12). Diese selektive Induzierbarkeit des CgA-Promotors im Magenkorpus steht im Einklang mit Untersuchungen zur Wirkung einer Hypergastrinämie auf die CgA-Protein- und mRNA-Expression im Rattenmagen, die eine selektive Steigerung der Expression beider Parameter im Bereich des Magenkorpus erbracht hatten (Literaturzitate siehe 12). Als physiologische Grundlage für diese Korpus-spezifische Regulation des CgA-Transgens ist eine spezifische Expression von CCK-B/Gastrin-Rezeptoren auf ECL-Zellen der Korpusmukosa anzusehen, während dieser Rezeptortyp auf anderen neuroendokrinen, CgA-exprimierenden Zellen des Magens nicht zu finden ist. Zusammenfassend zeigten unsere transgenen Studien, daß 4.8kB der Promotorsequenz des CgA-Gens alle regulatorischen Elemente umfaßt, die für eine Gewebe-spezifische Expression des CgA-Gens in neuroendokrinen Zellen erforderlich sind. Darüberhinaus erlaubt die Verwendung dieser CgA-Promotersequenz in transgenen Experimenten die Expression von heterologen Proteinen in neuroendokrinen Zellen, einschließlich der ECL-Zellen des Magens. Desweiteren weist das Transgen unter in vivo Bedingungen eine Stimulierbarkeit durch Gastrin auf, wodurch die Ergebnisse unserer in vitro Untersuchungen, die eine Transaktivierbarkeit des CgA-Promotors durch Gastrin erbracht hatten, bestätigt werden.

3.7. Inhibition der CgA-Promoteraktivität durch Interferon- α

Klinische Studien demonstrierten eindrucksvoll, daß bei Patienten mit neuroendokrinem Hypersekretionssyndrom die klinische Symptomatik durch Interferon- α -Therapie deutlich zu bessern ist. Neben diesem klinischen Effekt kommt es unter Interferon- α -Gabe gleichzeitig zu einer Verminderung der CgA-mRNA-Expression im Tumorgewebe. Diese Beobachtung deutet daraufhin, daß der Effekt von Interferon- α durch eine Verminderung der CgA-Expression zu erklären ist und das hierbei eine Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität des CgA-Gens von Relevanz sein könnte. Vor diesem Hintergrund gingen wir der Frage nach, inwieweit Interferon- α in der Lage ist die transkriptionelle Aktivität des CgA-Promotors zu beeinflussen und welche Mechanismen an einem solchen potentiellen Effekt von Interferon- α beteiligt sind. Unsere Untersuchungen zeigten, daß die Behandlung neuroendokriner Tumorzellen in vitro mit Interferon- α zur einer deutlichen Reduktion (ca. 50-60 %) der transkriptionellen Aktivität des CgA-Promotors führt (7). Die detaillierte Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen zeigte, daß der Effekt von Interferon- α hierbei durch Interferenz mit einem, im Bereich CgA -71 Bp bis -64 Bp lokalisierten, cAMP-responsiven Element (CRE) des proximalen CgA Kernpromotors beruht. Eigene Untersuchungen sowie vorangegangene Studien anderer Gruppen hatten dokumentiert, daß dieses Element eine essentielle Rolle für die basale und stimulierte Aktivität des CgA-Promotors in neuroendokrinen Zellen spielt und die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB an das CgA-CRE für die Regulation dieses Elementes verantwortlich ist (Literatur in 7). Der Transkriptionsfaktor CREB unterliegt hierbei einer Regulation durch das Adapterprotein CBP (CREB Binding Protein), das durch direkte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor CREB eine Verbindung zu verschiedenen CREB-regulierenden intrazellulären Signalkaskaden herstellt. Vor diesem Hintergrund zeigten unsere Studien, daß die inhibierende Wirkung von Interferon- α auf das CgA-CRE -71/-64 Bp-Element durch eine funktionelle Inhibition des Adapterproteins CBP hervorgerufen wird (7). Durch diese Untersuchung wurde erstmals ein potentieller Wirkmechanismus für die Wirkung von Interferon- α im Rahmen des neuroendokrinen Hypersekretionssyndroms nachgewiesen und das CgA-Gen als molekulares Ziel der Interferon- α -Therapie identifiziert. Weitere Studien müssen zeigen inwieweit

therapeutische Ansätze, die auf eine Verminderung der CBP/CREB-abhängigen CgA Expression beruhen, für eine Therapie des neuroendokrinen Hypersekretionssyndroms geeignet sind.

3.8 *Oxidativer Stress und HDC-Genregulation*

Eine Erhöhung des mukosalen oxidativen Stress repräsentiert eine charakteristische pathologische Situation für gastrale Epithelzellen. Hierbei scheint die zu beobachtende Aktivierung der Histaminsynthese einen wesentlichen Beitrag zum Ablauf der assoziierten Ulzerations- und Restitutionsmechanismen zu leisten. Daher untersuchten wir, ob oxidativer Stress eine direkte transaktivierende Wirkung auf das HDC-Gen ausüben kann und analysierten verschiedene molekulare Aspekte der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen. Hierbei fand sich, daß oxidativer Stress den hHDC-Promotor dosis- und zeitabhängig transaktiviert, wobei dieser Effekt durch Aktivierung einer Signalkaskade vermittelt wird, die sich im proximalen Bereich wesentlich vom Gastrin-stimulierten Signalweg unterscheidet (6). Während der Effekt von Gastrin auf die ERK-Kaskade durch einen Ras-unabhängigen, PKC-abhängigen Mechanismus vermittelt wird, führt oxidativer Stress zu einer Ras-abhängigen Aktivierung von ERKs, die im Gegensatz zur Gastrin-abhängigen Aktivierung des HDC-Promotors unabhängig von PKCs verläuft (6 und Abb.1). Ein wesentlicher Schritt in der Aktivierung der HDC-aktivierenden Kaskade durch oxidativen Stress, ist die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors (4). Die funktionelle Bedeutung der EGF-Rezeptoraktivierung für die Transmission der Effekte von oxidativem Stress wurde durch Expression einer Kinase-defizienten, dominant-negativen EGF-Rezeptormutante untersucht. Hierbei führte die funktionelle Inaktivierung des EGF-Rezeptors im AGS-B-Modell zu einer Reduktion der Wirkung von oxidativem Stress auf den hHDC-Promotor um etwa 50 % (6). Hinsichtlich der Aktivierung distaler Signalwege besteht eine Übereinstimmung zwischen der Wirkung von oxidativem Stress und Gastrin: von beiden Stimulatoren wird eine Kaskade aktiviert, die Raf, MEK-1 und ERKs umfaßt (6). Auf Promoterebene vermittelt der Sequenzbereich hHDC +2 bis +27 Bp den Effekt von oxidativem Stress. Dieses Element wurde in vorangegangenen Experimenten als Gastrin-responsives Element des HDC-Promotors identifiziert (6). Unsere Daten zeigen erstmals, daß oxidativer Stress die transkriptionelle Aktivität des humanen HDC-Gens direkt beeinflussen kann. Darüberhinaus

konnten wir die zugrundeliegende Signalkaskade weitgehend aufklären und hierbei wesentliche Unterschiede zu der Gastrin-aktivierten, HDC-regulierenden Signalkaskade nachweisen. Da Entstehung und Verlauf von Gastritiden und gastroduodenalen Ulzerationen mit erhöhten oxidativen Stress in der Magenmukosa einhergehen, tragen diese Daten zu einem besseren Verständnis der assoziierten molekularen Abläufe bei und können darüber hinaus helfen, neue Interventionsstrategien zur Behandlung dieser pathologischen Veränderungen zu entwickeln.

3.9 *Helicobacter pylori* und HDC-Genregulation

Nachdem klinische und tierexperimentelle Studien Hinweise auf eine Aktivierung des gastralen Histaminmetabolismus im Rahmen einer *Helicobacter pylori*-Infektion geliefert hatten, war es Ziel unserer Untersuchung zu klären, inwieweit das Bakterium einen direkten Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität des HDC-Gens nehmen kann. Da eine direkte Beeinflussung der HDC-Expression durch Hp einen neuen Pathogenitätsmechanismus repräsentieren würde, sind Kenntnisse über die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zur Verbesserung des ätiologischen Verständnisses der Hp-Infektion sowie zur Definition neuer therapeutischer Ansätze wünschenswert. Vor diesem Hintergrund lagen die Schwerpunkte der Untersuchung neben einer Charakterisierung der durch Hp aktivierten Signalwege, Transkriptionsfaktoren und DNA-Elemente, auf der Identifikation der beteiligten bakteriellen Virulenzfaktoren. Für die in vitro-Infektion mit Hp wurden AGS-B-Zellen nach Transfektion mit einem hHDC-Luziferase Reportergenkonstrukt mit 50-100 Bakterien/Epithelzelle kolonisiert und nach 3-stündiger Inkubation hinsichtlich ihrer Luziferaseaktivität analysiert. Unter diesen Infektionsbedingungen führte Hp zu einer 4-6-fachen Aktivitätssteigerung des humanen HDC-Promotors (11). Der Effekt von Hp war hierbei quantitativ ausgeprägter als der des Phorbolesters PMA, der in Voruntersuchungen als bislang potentester Stimulus der hHDC-Promotoraktivität charakterisiert werden konnte. Die nachfolgend durchgeführte 5'-Deletionsanalyse in Verbindung mit Elementtransferexperimenten zeigte, daß die zuvor als Gastrin-responsives Element des HDC-Promotors identifizierte Sequenz hHDC 5'-+1-ACCCTTTAAATAAAGGGCCCA-CACTGG+27-3' auch die Wirkung von Hp auf das hHDC-Gen vermittelt (11). Die durch Hp-aktivierten nukleären Proteine, die nach Hp-Infektion an dieses Element binden, entsprechen

den zuvor charakterisierten GAS-RE-BPs, also den durch Gastrin induzierten HDC-bindenden Transkriptionsfaktoren (8, 11).

Basierend auf diese Charakterisierung des transaktivierenden Einflusses von Hp auf das HDC-Gen, untersuchten wir nachfolgend die der Wirkung des Keimes hierbei zugrundeliegenden Virulenzfaktoren. Hierzu wurden in in vitro-Infektionsexperimenten mit AGS-B-Zellen verschiedene isogene Hp-Mutanten eingesetzt. In diesen Mutanten sind durch genetische Manipulation bestimmte Genbereiche, die durch vorangegangene Studien als Sequenzen mit relevanter Humanpathogenität identifiziert wurden, funktionell inaktiviert. Außerhalb dieser pathogenen Genregionen liegenden Gene des Bakteriums bleiben hierbei unverändert und entsprechen dem Hp-„Wildtyp“. Unsere Untersuchungen ergaben, daß die transaktivierende Wirkung von Hp auf den humanen HDC-Promotor unabhängig von Virulenzfaktoren ist, die der CagA- oder VacA-Region des Keimes zuzuordnen sind. Beide Genbereiche wurden in klinischen Studien sowie tierexperimentell als Virulenzfaktoren identifiziert durch die eine erhöhte Humanpathogenität von Hp-Stämmen erklärt werden kann, wobei die Wirkung von cagA-PAI an die Aktivierung von JNK-assoziierten Signalkaskaden gebunden war. Im Gegensatz hierzu erbrachte unsere Untersuchung den überraschenden Befund, daß der HDC-aktivierende Effekt des Bakteriums auf einer Ras-unabhängigen Stimulation von Raf > MEK-1 > ERKs beruht und somit der durch Gastrin aktivierten Signalkaskade entspricht (11).

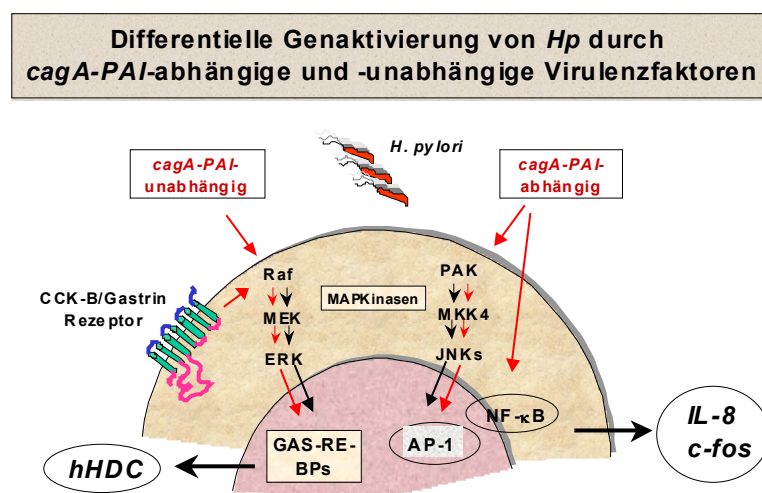


Abb. 4. Schematische Darstellung der molekularen Interaktionen von *Hp* mit Epitelzellen des Magens. Abkürzungen: TF1 und TF2 = Transkriptionsfaktor 1 und 2; GAS-RE-BPs=Gastrin-responsive Element Binding Proteins; IL-8=Interleukin 8. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen, daß Hp in der Lage ist, das Schlüsselgen der Histaminsynthese im Magen direkt zu aktivieren, wobei diese Wirkung auf die Aktivierung eines neuen Promotorelements und bislang noch nicht identifizierten Transkriptionsfaktoren beruht. Der zugrundeliegende Signalweg unterscheidet sich wesentlich von bislang bekannten Hp-aktivierten Signalkaskaden, wobei die Aktivierung dieser Signalkaskade durch Hp unabhängig von bislang bekannten Virulenzfaktoren abläuft. Die Transaktivierung des HDC-Promotors durch Hp scheint daher auf einem bislang nicht bekannten Mechanismus zu beruhen, durch den der Keim eine transkriptionelle Aktivierung von epithelial exprimierten Genen seines Wirtes auslösen kann (Abb. 4). Die Charakterisierung dieses neuen Mechanismus der Wirkung von Hp auf epitheliale Zielzellen im menschlichen Magen erweitert das Verständnis der molekularen Interaktion des Bakteriums mit seinem Wirt und kann zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Behandlung von Hp-assoziierten Erkrankungen beitragen. Hierbei erscheint insbesondere der Eingriff in Signalkaskaden sowie Transkriptionsfaktor-DNA-Interaktionen als attraktiv. Erste tierexperimentelle Daten dokumentieren die potentielle Wirksamkeit solcher Ansätze zur Behandlung von Hp-getriggerten Veränderungen der Magenschleimhaut in vivo. Angesichts der zunehmenden Resistenzentwicklung gegen Antibiotika, die zur Eradikationstherapie von Hp eingesetzt werden, sowie der relativ hohen Therapiekosten bei hoher Inzidenz von Hp-assoziierten Erkrankungen in Ländern der Dritten Welt, gewinnen alternative Therapiekonzepte zunehmend an Bedeutung. Inwieweit diese ersten experimentellen Ansätze zur Entwicklung anwendbarer Therapeutika führen bleibt in weiteren Studien zu klären.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Aktivierung des HDC-Gens durch Gastrin ist ein zentraler Schritt in der Regulation der Magensäureproduktion und -Sekretion und spielt darüber hinaus eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Gastritiden und gastroduodenalen Ulzerationen. Unsere Untersuchungen konnten erstmals die molekularen Grundlagen der Wirkung von Gastrin auf das Schlüsselenzym der Magensäureregulation aufklären und hierbei ein bislang nicht vorbeschriebenes cis-regulatorisches Promotorelement sowie zwei bislang unbekannte Transkriptionsfaktoren als Vermittler der Gastrinwirkung identifizieren. Neben der Aktivierung des HDC-Gens ist die Stimulation der CgA-Expression ein zentraler Aspekt der physiologischen Wirkung von Gastrin auf ECL-Zellen der menschlichen Magenmukosa, wobei eine koordinierte Regulation beider Gene durch das Peptidhormon funktionell von Bedeutung ist. Unsere Untersuchungen dokumentieren, daß die transaktivierende Wirkung von Gastrin auf das CgA-Gen durch die gleiche Signalkaskade vermittelt wird, durch die das Peptidhormon auch das HDC-Gen stimuliert. Auf Ebene der Promotorregulation hingegen liegen dem Effekt von Gastrin auf das CgA-Gen mit den Transkriptionsfaktoren Sp1 und CREB zwei nukleäre Proteine zugrunde, die für die Regulation des HDC-Promotors keine Bedeutung haben. Während CREB bereits durch andere Untersucher als wesentlicher Transkriptionsfaktor für die Regulation des CgA-Promotors beschrieben wurde, konnte Sp1 durch unsere Studien erstmals eine Bedeutung für die Regulation des CgA-Gens zugeordnet werden. Basierend auf diesen Ergebnissen läßt sich ein Modell der Gastrin-abhängigen Genregulation in ECL-Zellen entwickeln, demzufolge die Aktivierung einer identischen Signalkaskade die Grundlage für die koordinierte Expression des HDC- und CgA-Gens bildet, während durch unterschiedliche Gastrin-responsive Promotorelemente und Transkriptionsfaktoren in beiden Genen die strukturelle Basis für eine individuelle, gen-spezifische Modulation der Gastrinwirkung gegeben ist. Vor dem Hintergrund der Bedeutung von Gastrin für die Kontrolle von gastraler Säureregulation, Mukosaproliferation und -Differenzierung können diese Daten einen wesentlichen Beitrag zum molekularen Verständnis dieser Abläufe leisten und helfen, neue molekulare Interventionspunkte zu definieren.

Unsere transgenen Untersuchungen des CgA-Promotors bestätigten die *in vitro* Daten einer transkriptionellen Regulation der CgA-Gens durch Gastrin und zeigen, daß durch Verwendung eines 4.8kB-langen CgA-Promotorfragmentes eine neuroendokrin-spezifische Expression von Transgenen im Mausmodell erzielt werden kann. Hierdurch konnte erstmals

ein Transgen definiert werden, daß die Expression von heterologen Proteinen im neuroendokrinen System einschließlich der gastralen ECL-Zellen erlaubt. Durch Verwendung dieses CgA-Promotorfragmentes in nachfolgenden Untersuchungen werden transgene in vivo Studien ermöglicht, die wesentlich zur Verbesserung des Verständnisses der Physiologie und Pathophysiologie des neuroendokrinen Systems beitragen können.

Die klinische Symptomatik von neuroendokrinen Tumorpatienten mit Hypersekretionssyndrom ist durch Interferon- α -Therapie häufig deutlich zu bessern, die molekularen Zusammenhänge der Interferon- α -Wirkung hierbei waren jedoch bislang weitgehend unklar. Durch unsere Untersuchungen konnte erstmals ein potentieller Wirkmechanismus von Interferon- α im Rahmen des neuroendokrinen Hypersekretionssyndroms nachgewiesen und das CgA-Gen als molekulares Ziel der Interferon- α -Therapie identifiziert werden. Hierbei wird die inhibierende Wirkung von Interferon- α durch eine funktionelle Inhibition des Adapterproteins CBP und konsekutive Reduktion der Aktivität des CgA-CRE -71/-64 Bp-Elementes hervorgerufen. Die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, die auf einer Verminderung der CBP/CREB-abhängigen CgA-Expression beruhen ist denkbar, der klinische Wert solcher Interventionen muß jedoch in weiteren Studien überprüft werden.

Eine Erhöhung des mukosalen oxidativen Stresses sowie die Exposition mit *Helicobacter pylori* repräsentieren zwei charakteristische pathologische Situationen für gastrale Epithelzellen. Da beide Zustände mit einer Aktivierung der Histaminsynthese assoziiert sind, analysierten wir verschiedene molekulare Aspekte der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen. Hierbei konnte durch unsere Studien erstmals eine transaktivierende Wirkung von oxidativem Stress auf das HDC-Gen nachgewiesen und eine EGF-Rezeptor-vermittelte Aktivierung der ERK-Signalkaskade als entscheidender Regulationsschritt identifiziert werden. Auf Promotorebene werden die Effekte von oxidativem Stress durch das gleiche Element vermittelt, das auch für die Wirkung von Gastrin auf den HDC-Promotor essentiell ist. Da Gastritiden und gastroduodenale Ulzerationen mit erhöhtem oxidativen Stress in der Magenmukosa assoziiert sind, tragen diese Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Abläufe bei und können darüber hinaus helfen neue Interventionsstrategien zur Behandlung dieser pathologischen Veränderungen zu entwickeln.

Ein weiteres wesentliches Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen war der Nachweis eines direkten Effektes von *Helicobacter pylori* auf das HDC-Gen. Überraschenderweise zeigte

sich, daß das Bakterium hierbei den gleichen molekularen Mechanismus aktiviert, der auch von Gastrin zur Beeinflussung der HDC-Genaktivität benutzt wird. Darüberhinaus fand sich, daß offenbar bislang nicht bekannte bakterielle Virulenzfaktoren die Aktivierung des HDC-Gens auslösen. Unsere Befunde zeigen zusammenfassend einen bislang noch nicht beschriebenen Mechanismus der Interaktion von *Helicobacter pylori* mit Epithelzellen des Magens auf. Diese Ergebnisse dokumentieren einerseits einen potentiellen Mechanismus für die Interaktion des Bakteriums mit den physiologischen Regelkreisen der Magensäureregulation und tragen andererseits durch die Definition von molekularen Angriffspunkten zur Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen bei.

5. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Bertram Wiedenmann für die permanente Unterstützung sowie seine ständige Bereitschaft zur kritischen Diskussion. Danken möchte ich desweiteren Herrn Professor Dr. Timothy C. Wang, Massachusetts General Hospital, Boston, USA, für seine wertvollen inhaltlichen Anregungen sowie Herrn Professor Dr. Stefan Rosewicz für seine Unterstützung und wichtige fachliche Anregungen.

7. Lebenslauf

Name:

Dr. med. Michael Höcker

Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Dienstanschrift:

Universitätsklinikum Charité, Campus Virchow-Klinikum,

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt

Hepatologie und Gastroenterologie,

Augustenburger Platz 1

13353 Berlin

Tel.: 030-450-553022

Fax: 030-450-553902

Email: hoecker@charite.de

Privatadresse: Paul-Lincke Ufer 7

10999 Berlin,

Tel: 030-7935421

Geburtsdatum: 18. Mai 1961

Geburtsort: Herford/Westfalen

Akademische Ausbildung:

- 1982-1985: Studium der Biologie und Tiermedizin, Universität Hannover

- 1985: Beginn des Studiums der Humanmedizin, Georg-August Universität Göttingen

- Mai 1992: Abschluss des Medizinstudiums, Georg-August Universität Göttingen

(Dissertation: Isolierte Pankreasazini der Ratte: Modifikation und Evaluierung eines Modells zur Charakterisierung der exokrinen Pankreassekretion und zur Messung von Cholezystokinin im Plasma. (Doktorvater: Prof. Dr. med. U.R. Fölsch)

- 1992-1993: Arzt im Praktikum, I. Medizinische Klinik der Christian-Albrechts Universität Kiel, Kiel (Leiter: Prof. Dr. med. U.R. Fölsch)

- 1993-1996: Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft und Research Fellow Gastrointestinal Unit und Department of Medicine, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston MA, USA. (Leiter: Daniel K. Podolsky, M. D.)

- 04-1996/03-1998: Wissenschaftlicher Mitarbeiter Medizinische Klinik I, Gastroenterologie und Infektiologie Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin (Leiter: Prof. Dr. med. E.-O. Riecken)

- seit 04-1998: Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Universitätsklinikum Charité, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, (Leiter: Prof. Dr. med. B. Wiedenmann)

8. Verzeichnis der Originalarbeiten mit direkter Relevanz zur Habilitationsschrift

1. Höcker M, Zhang Z, Fenstermacher DA, Tagerud S, Chulak MB, Joseph D, Wang TC: Activation of the human histidinedecarboxylase promoter by gastrin through a protein kinase C pathway.. Am J Physiol. 1996, 270, S.G619-G633,
2. Höcker M, Zhang Z, Merchant J, Wang TC: Gastrin regulates the histidine decarboxylase promoter through an AP-1-dependent pathway. Am J Physiol. 1997, 272, S.G822-830,
3. Zhang Z, Höcker M, Koh TJ, Wang TCJ: The human histidine decarboxylase promoter is regulated by gastrin and phorbol12-myristate 13-acetate through a downstream cis-acting element.. J Biol Chem. 1996, 271, S.14188-14197,
4. Höcker M, Henihan RJ, Rosewicz S, Riecken EO, Zhang Z, Koh TJ, WAng TC: Gastrin and phorbol 12-myristate 13-acetate regulate the human histidine decarboxylase promoter through Raf-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-related signaling pathways in gastric cancer cells.. J Biol Chem. 1997, 272, S.27015-27014,
5. Höcker M, Rosenberg I, Henihan R, Xavier R, Wiedenmann B, Rosewicz S, Podolsky DK, Wang TC: Oxidative stress activates the human histidine decarboxylase promoter in AGS gastric cancer cells. J Biol Chem. 1998, 273, S.23046-23054,
6. Höcker M, Raychouwdhury R, Plath T, O'Connor DT, Wu H, Wiedenmann B, Rosewicz S, WAng TC: Sp1 and CREB mediate the effect of gastrin on the chrromogranin A promoter.. J Biol Chem. 1998, 273, S.30000-30007,
7. Raychodhury R, Zhang Z, Höcker M, Wang TC: Activation of the human histidine decarboxylase gene transcription by gastrin is mediated by two distinct nuclear factors.. J Biol Chem. 1999, 274, S.20961-20969,
8. Höcker M, Plath T, Riecken EO, WAng TC, Wiedenmann B, Rosewicz S: Interferon-alpha inhibits chromogranin A promoter activity in neuroendocrine pancreatic cancer cells.. FEBS Lett. 1999, 458, S.378-382,

9. Höcker M, John M, Anagnostopoulos I, Buhr HJ, Solimena M, Gasnier B, Henry JP, Wang TC, Wiedenmann B: Molecular dissection of pathways in human gastric enterochromaffin-like cells: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol.* 1999, *112*, S.205-214,
10. Höcker, Weßler S, Fischer W, Wang TC, Rosewicz S, Hass R, Wiedenmann B, Meyer TF, Naumann M: Helicobacter pylori activates the histidine decarboxylase promoter through a mitogen-activated protein kinase pathway independent of pathogenicity island-encoded factors. *J Biol Chem.* 2000, *275*, S.3629-3636,
11. Sturany S, Van Lint J, Muller F, Wilda M, Höcker M, Brex A, Gern U, Vandenheede J, Gress T, Adler G, Seufferlein T: Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2: a novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases. *J Biol Chem.* 2000, *276*, S.23310-3318,
12. Höcker M, Cramer T, O'Connor DT, Rosewicz S, Wiedenmann B, Wang TC : Neuroendocrine-specific and gastrin-dependent regulation of a chromogranin A-luciferase fusion gene in transgenic mice. *Gastroenterology.* 2001, *121*, S.43-55,